

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-322568

(43)公開日 平成8年(1996)12月10日

(51) Int.Cl. [®]	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
A 0 1 K 67/027			A 0 1 K 67/027	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A
// C 1 2 N 5/10		9281-4B	C 1 2 N 5/00	B
			審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 6 頁)	

(21)出願番号 特願平7-157037

(22)出願日 平成7年(1995)5月31日

(71)出願人 395007255

株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林
519番地

(72)発明者 高橋 利一
栃木県下都賀郡石橋町大字下古山231 倉
井マンション3-D

(72)発明者 平林 真澄
栃木県宇都宮市兵庫塚2-19-11

(72)発明者 上田 正次
埼玉県川越市今福1672-1-719

(74)代理人 弁理士 藤野 清也 (外1名)

(54)【発明の名称】 DNA顕微注入法

(57)【要約】

【構成】 トランスジェニックアニマル作出のために前核期受精卵の前核内にDNAを顕微注入するに当り、前核期受精卵の核膜にDNAを入れた注入ビベットの針先を圧し当てた後、針先に微振動を与えることにより核膜を貫通させてDNAを注入するDNAの顕微注入法。

【効果】 本発明により、前核期卵の前核内へのDNA溶液の安定した注入を行なうことができ、注入卵の生存率を飛躍的に高めることができる。従って、トランスジェニックアニマルの作出効率を大幅に向上することができる。

医学第12巻、第2号（通巻144号）（1994）、122～129頁、羊土社出版」に記載されている。その中で注入の注意として、注入ピペットの先端が十分に細いこと、挿入前に支持ピペット、雄性前核、注入ピペットを一直線に配置し、注入ピペットを透明帯から前核にまで一息に挿入する等の改良点が挙げられている。しかし、このような方法では、極端に細い注入ピペットは粘性の高いDNA溶液を注入する場合には不利である。また、一息に注入ピペットを挿入すると、注入ピペットが深く入り過ぎて前核を串刺しにしたり、核膜を大きく傷つけたり、さらに細胞膜を過度に傷つけたりして、注入ピペットを抜いた後に卵外に注入したDNA溶液が漏出し、注入操作した卵の生存性が損なわれる等の不都合を生じる。この結果、操作した卵の生存率がマウスでは60～80%であるのに対し、ラットでは約40～60%と低くなってしまい、トランシジェニック個体の高い作出効率を得る上で不利であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上述の様に、ラット等の核膜に弾力性があり、細胞膜が脆弱なる受精卵では、注入ピペットの針先の前核内への導入が難しく、DNA溶液を前核への注入時に脆弱な細胞膜を注入操作により大きく損傷して、DNA溶液を注入した操作受精卵の生存率が低く、多数の受精卵を準備してDNA溶液の注入操作を行なう必要があった。このため、ラットは実験用動物としての有用性の高さにも係わらず、トランシジェニック個体の作出が遅れており、有効なDNA溶液の前核期受精卵への注入法の開発が切望されていた。即ち、本発明は、顕微注入法によってトランシジェニック動物を作出する際に、効率よくDNA溶液を注入する方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】上述の状況に鑑み、本発明者は、注入ピペットの針先を極端に細くすることなく、弾力性のある核膜に過度の損傷を与えない制御可能なDNA溶液の注入方法の開発に鋭意努力した結果、顕微注入法において受精卵にDNA溶液を注入する際、注入ピペット挿入の針先に微振動を与えることにより、80%以上の生存率が得られる新しい顕微注入法を見出すに至った。さらに、注入ピペットの針先を前核膜に一旦圧し当てた後には、注入ピペットの針先に適度な微振動を与えることにより注入ピペットの針先が核膜を貫通することを促すことが、無理のない前核内への注入ピペットの針先の挿入方法であることを見出した。

【0007】すなわち、本発明は、前核期受精卵前核内にDNAを顕微注入するに当り、前核期受精卵の核膜にDNAを入れた注入ピペットの針先を圧し当てた後、針先に微振動を与えることにより核膜を貫通させることによるDNAの顕微注入法に関する。更に、本方法では、支持ピペットで固定した前核期受精卵の雄性前核膜

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】前核期受精卵の前核内にDNAを顕微注入するに当り、該受精卵の核膜にDNAを入れた注入ピペットの針先を圧し当てた後、針先に微振動を与えることにより核膜を貫通させることを特徴とする、DNAの顕微注入法。

【請求項2】前核期受精卵がラットのものである、請求項1記載の顕微注入法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、トランシジェニック動物作出のために前核期受精卵前核内へのDNA溶液の顕微注入法（マイクロインジェクション法）に関する。本発明の方法によるとDNA注入操作した卵の生存率を飛躍的に高め、トランシジェニック動物の作出効率を大幅に改善することができる。

【0002】

【従来の技術】近年、組換えDNA技術の進歩により、異種遺伝子を生物個体で発現させたトランシジェニック動物の作出が可能になった。この技術は遺伝子の機能研究のみならず、作出了した疾患モデル動物を用いた発病機構の研究、医薬品開発を含む治療方法の開発、更に医薬品の生産手段として、医学の発展に寄与するところが多くあり注目されている。特にラットは、マウスと同様に妊娠期間、性成熟期間が短く、産仔数も10匹前後と多く、且つ体重がマウスの約10倍程度であるので、臓器摘出などの細やかな実験施設を施すことができることから、実験用動物としての有用性が高い。また、高血圧症や発癌研究など過去のデータ蓄積も豊富であり、これらの成績と直接比較して検討できるため、トランシジェニックラット作出の意義は高い。

【0003】従来、トランシジェニック動物の作出には、目的とするDNAの溶液を前核期の受精卵へマイクロピペットを用いて注入する顕微注入法が多く用いられてきた。しかしながら、この方法には、改善すべき点も多く残っている。その一つとして、ラット等の前核期受精卵では、細胞膜が脆弱で前核膜が弾力性に富むため、注入針先の前核内への良好な挿入が難しいことが挙げられる。即ち、注入針先をうまく前核内に挿入することができず、前核の外周辺にDNA溶液が注入されたり、注入された場合でも、前核外にDNA溶液が漏出してしまうことがある。更に、注入操作により細胞膜を大きく破損して、注入後に前核や細胞質が漏出する等の過剰な損傷を卵に与えるため、注入操作した卵の生存率が30～60%程度と低く、仮親に移植できる注入操作した卵を十分に得るために非常に多くの卵を処理する必要があった。

【0004】これらの問題に対し、顕微注入法の改善方法が「新生化学実験講座19、動物実験法(1991)、309～313頁、日本生化学会編、東京化学同人出版」や「実験

10
20
30
40

医学第12巻、第2号（通巻144号）（1994）、122～129頁、羊土社出版」に記載されている。その中で注入の注意として、注入ピペットの先端が十分に細いこと、挿入前に支持ピペット、雄性前核、注入ピペットを一直線に配置し、注入ピペットを透明帯から前核にまで一息に挿入する等の改良点が挙げられている。しかし、このような方法では、極端に細い注入ピペットは粘性の高いDNA溶液を注入する場合には不利である。また、一息に注入ピペットを挿入すると、注入ピペットが深く入り過ぎて前核を串刺しにしたり、核膜を大きく傷つけたり、さらに細胞膜を過度に傷つけたりして、注入ピペットを抜いた後に卵外に注入したDNA溶液が漏出し、注入操作した卵の生存性が損なわれる等の不都合を生じる。この結果、操作した卵の生存率がマウスでは60～80%であるのに対し、ラットでは約40～60%と低くなってしまい、トランシジェニック個体の高い作出効率を得る上で不利であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上述の様に、ラット等の核膜に弾力性があり、細胞膜が脆弱なる受精卵では、注入ピペットの針先の前核内への導入が難しく、DNA溶液を前核への注入時に脆弱な細胞膜を注入操作により大きく損傷して、DNA溶液を注入した操作受精卵の生存率が低く、多数の受精卵を準備してDNA溶液の注入操作を行なう必要があった。このため、ラットは実験用動物としての有用性の高さにも係わらず、トランシジェニック個体の作出が遅れており、有効なDNA溶液の前核期受精卵への注入法の開発が切望されていた。即ち、本発明は、顕微注入法によってトランシジェニック動物を作出する際に、効率よくDNA溶液を注入する方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】上述の状況に鑑み、本発明者は、注入ピペットの針先を極端に細くすることなく、弾力性のある核膜に過度の損傷を与えない制御可能なDNA溶液の注入方法の開発に鋭意努力した結果、顕微注入法において受精卵にDNA溶液を注入する際、注入ピペット挿入の針先に微振動を与えることにより、80%以上の生存率が得られる新しい顕微注入法を見出すに至った。さらに、注入ピペットの針先を前核膜に一旦圧し当てた後には、注入ピペットの針先に適度な微振動を与えることにより注入ピペットの針先が核膜を貫通することを促すことが、無理のない前核内への注入ピペットの針先の挿入方法であることを見出した。

【0007】すなわち、本発明は、前核期受精卵前核内にDNAを顕微注入するに当り、前核期受精卵の核膜にDNAを入れた注入ピペットの針先を圧し当てた後、針先に微振動を与えることにより核膜を貫通させることによるDNAの顕微注入法に関する。更に、本方法では、支持ピペットで固定した前核期受精卵の雄性前核膜

に注入針先を一度圧し当て、注入ピペット針先の挿入動作を一旦停止させた後に、あらためて挿入動作を開始するため、顕微カメラに設置したセンサーでその挿入位置を確認し、微震動操作による前核内への注入ピペットの針先の挿入操作を行うことができるため機械を用いた自動化システムを構築する上でも有利である。この様な注入操作により核膜の過度の損傷を防止し、注入操作による脆弱な細胞膜の物理的損傷を最小限に止め、無理なく注入ピペット針先を前核内へ挿入することができることによりDNA溶液の注入操作後の受精卵の生存率を飛躍的に向上させることができ、トランスジェニック動物を作出する上で非常に有用である。本発明におけるDNA溶液としては、例えは、ヒト成長ホルモンDNA、ヒトイントーフェロン、ヒトイントーロイキン2、ヒトコロニーステレオイシン等のトランスジェニック動物作出のための溶液を例示することができる。また微振動は、細胞表面に押し当てた針先が、細胞からはずれることのない程度に振動している状態をさす。

【0008】以下、本発明の詳細を実施例に従って説明するが、これらによって本発明は何ら限定されるものではない。

【0009】

【実施例1】

DNA溶液の前核期受精卵への注入操作後の操作卵の生存率の比較

(1) 注入するDNA溶液の調製方法

注入した導入遺伝子の構造：本実施例で使用した2種の導入遺伝子（ α S1CN/IL2-2, α S1CN/IL2-4）は、ウシ α S1カゼインプロモーターの下流にヒト成長ホルモン遺伝子を導入した α S1CN/hGH (T.Ninomiya et al.(1994)

: Function of milk protein gene 5' flanking regions on human growth hormone gene. Mol.Reprod. Dev. 37, 276-283) (図1) のヒト成長ホルモン遺伝子の第2エクソンのAatIIサイト或いは第4エクソンのBbeIサイトに、合成ヒトイントーロイキン-2c DNA (British Biotechnology Ltdより購入した谷口らの報告する IL-2c DNA : T.Taniguchi et al.(1983) : Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.

Nature 302, 276-283) (図2) のHindIIIとEcoRIの切断片を各制限酵素用リンクーを介して挿入することにより作製した。作製した α S1CN/IL2-2の遺伝子構造の概略を図3に、 α S1CN/IL2-4の遺伝子構造の概略を図4に各々示す。

【0010】DNA(導入遺伝子)溶液の調製：注入し

たDNA溶液は下記の手順で調製した。即ち、注入DNA断片を含むプラスミド(プラスミドpUC12のAmp^rおよび大腸菌の複製開始点を含むHindIIIとEcoRIの約2.7kb断片のEcoRI部位をSalIに変換した断片(即ちベクター)に各挿入遺伝子を結合したもの)(図5)を制限酵素(HindIII, SalI)で消化し、1%アガロースゲル電気泳動によりベクター部分を除去した直鎖状の導入遺伝子(DNA断片)を分離した。GENECLEAN II(BIO 101 INC; ナカシ薬品取扱)を用い、NaI溶液でアガロースを溶解して得たDNA断片をシリカゲルマトリクスのGLASSMILKに吸着させて洗浄後に溶出して精製した。得られた精製DNAを5 μ g/mlとなるように注入用バッファー(0.1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH7.6)で溶解した。尚、注入操作する使用期間までの保存時間のある場合は-20°Cで保存した。

【0011】(2) 前核期受精卵へ調製方法

8週齢のWistarラットを日本チャールスリバー社より購入し、明暗サイクル12時間(明時間: 4:00~16:00)、22±4°Cで飼育して実験に供した。脛スメアにより雌の性周期を観察してホルモン処理日を選択した(T.Nobu naga & K.Nakamura (1967): Fundamental study on the physiology of estrous cycle in the Wister-Iamamichi rat. I. Cyclic change of vaginal smear observed continuously at intervals of 3 hours. Jpn. J. Anim. Reprod. 14, 1-7)。先ず、雌ラットに150IU/kgの妊娠馬血清性腺刺激ホルモン(日本全薬: PMS全薬, PMSG: pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)を腹腔内投与して過剝排卵処理を行い、その後4時間後に75IU/kgのヒト絨毛性ゴナドトロビン

(三共臍器: プベローゲン, hCG; human chorionic gonadotropin: hCG)を投与し、種雄との同居により交配を行った。hCG投与2時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流および卵培養にはmKR B液(Y.Toyoda & MC Chang : J. Reprod. Fertil. 36, 9-22 (1974))を使用した。mKR B液の組成を表1に示す。卵管灌流液には0.1%ヒアルロニダーゼ(シグマ社製, Hyaluronidase H3606)を添加し、37°Cで5分間の酵素処理による卵丘細胞除去を行い、mKR B液で3回洗浄することにより酵素を除去した後、注入操作までCO₂-インキュベーター内(5%CO₂-95% Air, 37°C, 飽和湿度)に保存した。

【0012】

【表1】

m K R B 液の組成

成 分	mg/100ml	成 分	mg/100ml
NaCl	552.5	ビルビン酸ナトリウム	6.0
KCl	35.6	乳酸ナトリウム(60%シリップ)	0.36ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25.1	ベニシリン G カリウム(10万U/mg)	7.5
MgSO ₄ (7H ₂ O)	29.4	硫酸ストレptomycin	5.0
KH ₂ PO ₄	16.2	タク血清アルブミン	400.0
NaHCO ₃	210.6	1%フェノールラッカ	0.02ml
グルコース	100.0		

【0013】(3) 前核期受精卵へのD A N溶液の注入
注入ピペットの作製：注入ピペットはガラスキャビラリーチューブ(G-1:成茂社製)、ブラー(PN-3:成茂社製)、マイクロフォージ(MF-79:成茂社製)を使用しガラスキャビラリーチューブをブラーにて引き切り、フッ化水素、シグマコート(シグマ社製, SI GMACOAT SL-2)及び蒸留水で洗浄後、マイクロフォージでマイクロマニピュレーターに装着した時に顕微鏡ステージと水平にセットできるように先端部分を曲げた。

【0014】D N Aの注入：顕微鏡(ニコン社製 DIAPH OTO-TMD300微分緩衝装置付)に装着したマイクロマニピュレーター(成茂社製 M0-102/M0-103)を用いて、パラフィンオイルで覆った20%ウシ胎仔血清(F C S)を含むリン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline: P B S)40μl液滴中で前記受精卵を保定用キャビラリーで保持しながら注入用ピペットで顕微注入を実施した。従来法によるD N A溶液の注入(S.Hochi et al.(1990): Successful production of transgenic rats. Animal Biotechnology 1, 175-184)は、挿入前に支持ピペット、雄性前核、注入ピペットを一直線に配置し、注入ピペットを透明帯から前核にまで一気に挿入してD N A溶液の注入を行った。また、本方法による改良法では、一度支持ピペットで固定した前核期受精卵の前核膜*

顕微注入法の比較(培養24時間後の操作卵の生存率の比較)

*に注入ピペットの針先を圧し当て注入ピペットの挿入の作動を一旦停止させた。次に、顕微鏡のステージを軽くたたくことにより注入針先に微震動を与えて前核内へ注入ピペットの針先を挿入してD N A溶液の注入を行った。D N A溶液の注入量は前核の膨化によりモニターして前核の膨化が飽和状態になるよう設定した。また、注入速度は数秒(5~6秒)で膨化が飽和する様に設定した。注入操作を終了した操作卵をm K R B液に移して5%CO₂-9.5%A i r(37℃)のCO₂-インキュベーター内で培養した。

【0015】(4) D N A溶液の注入操作を施した前核期受精卵の24時間後の生存率の比較

上述のD N A溶液注入操作後CO₂-インキュベーター内で24時間培養した注入操作を施した卵の生存数は顕微鏡下で形態観察して求めた。变成していない1細胞期あるいは2細胞期にある卵を生存卵と判別して計数した。前核期受精卵へのD N A溶液の注入操作を同一のD N A溶液を用いて上記の本発明による注入方法と従来の注入方法で実施した注入操作卵の24時間後の生存率を求めた。結果を表2に示す。

【0016】

【表2】

導入D N A	従来法				本発明法			
	実験回数	操作卵数	生存卵数	生存率(%)	実験回数	操作卵数	生存卵数	生存率(%)
αSICN/IL2-2	3	159	91	59.4	6	676	576	85.7
αSICN/IL2-4	4	567	367	64.7	5	686	567	82.7
計	7	726	458	63.1	11	1362	1143	83.9

【0017】この結果、本発明法により、DNA溶液注入操作24時間後の卵の生存率が約63%から約84%に向上した。即ち、本発明方法は従来の顕微注入法に比べ操作卵の生存率がいちじるしく向上した優れた方法であることを示す。

【0018】

【実施例2】

DNA溶液の前核期受精卵への注入操作後の操作卵の生存率の比較

以下に示した種々のDNA溶液を使用し、実施例1に記載した方法により前核期受精卵へのDNA溶液の注入を行い、培養24時間後の注入操作卵の生存率を本発明方法と従来法とで比較した。 α S1CN/IL2-1, α 1CN/IL2-5は、実施例1に記載した方法と同様の方法で作製した。作製した α S1CN/IL2-1の遺伝子構造の概略を図6に、 α S1CN/IL2-5の遺伝子構造の概略を図7に各々示す。 $b\alpha$ LA/hGH

(T.Ninomiya et al. Mol Reprod Dev 37, 276-283, (1994))は、制限酵素HindIIIとEcoRIの部分切断により*

顕微注入法の比較（培養24時間後の操作卵の生存率の比較）

従来法					本発明法				
導入DNA	実験回数	操作卵数	生存卵数	生存率(%)	導入DNA	実験回数	操作卵数	生存卵数	生存率(%)
IL2-5	5	406	263	64.8	IL2-1	5	608	506	83.2
α LA/hGH	3	100	61	61.0	α S133	3	391	330	84.4
					α S158	3	271	222	81.9
計	8	506	324	64.0	計	11	1,270	1,058	83.3

【0021】この結果、本発明方法により、DNA溶液注入操作24時間後の卵の生存率が約64%から約83%に向上した。即ち、本発明方法によると従来の顕微注入法に比べ操作卵の生存率がいちじるしく高まり本発明方法が優れた方法であることを示す。

【0022】

【発明の効果】本発明により、前核期受精卵へのDNA溶液の注入操作が卵に与える物理的損傷を最小限に止め、操作卵の生存率を従来法と比較して飛躍的に高めることができる。従って、トランシジェニック動物個体の作出効率を大幅に向上することができる。また、注入操作を機械化して自動化することができ、多数の卵の前核内にDNA溶液を注入することができる。

【図面の簡単な説明】

* 得られた目的遺伝子断片を実施例1に記載した方法に準じて調製した。作製した $b\alpha$ LA/hGHの遺伝子構造とそれを導入したプラスミドの概略を図8に示す。また、 α S133と α S158は、それぞれ制限酵素EcoRIおよびHindIIIと制限酵素XbaIの制限酵素消化により目的遺伝子断片を切り出し例1に記載した方法(ヒトOSF-2 cDNA構造の詳細は文献[S.Takeshita et al. Biochem J. 294, 271-278 (1993), 特開平5-268982]による。)に準じて得られたDNA断片を作製した。作製した α S133の遺伝子構造とそれを導入したプラスミドの構造の概略を図9に、 α S158の遺伝子構造とそれを導入したプラスミドの構造の概略を図10に各々示す。

【0019】実施例1と同様に、得られたDNA溶液を従来法および本発明方法により前核期受精卵に注入し、CO₂インキュベーター内で24時間培養後の注入操作した卵の生存率を求めた。結果を表3に示す。

【0020】

【表3】

【図1】 α S1CN/hGFの構造の概略を示す。

【図2】ヒトIL-2 cDNAの構造の概略を示す。

【図3】 α S1CN/IL2-2の構造の概略を示す。

【図4】 α S1CN/IL2-5の構造の概略を示す。

【図5】pUC12プラスミドと導入遺伝子の導入部位の構造の概略を示す。

【図6】 α S1CN/IL2-1の構造の概略を示す。

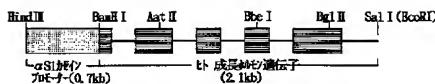
【図7】 α S1CN/IL2-5の構造の概略を示す。

【図8】 $b\alpha$ LA/hGHを導入したプラスミドの構造の概略を示す。

【図9】 α S133の構造及びそれを導入したプラスミドの構造の概略を示す。

【図10】 α S158の構造及びそれを導入したプラスミドの構造の概略を示す。

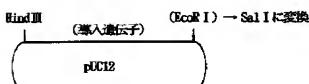
【図1】



【図2】



【図5】



【図3】



【図4】



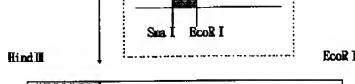
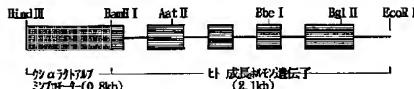
【図6】



【図7】



【図8】



【図10】

